

# **DNA TECHNIKY IDENTIFIKACE ŽIVOČIŠNÝCH DRUHŮ V KRMIVU A POTRAVINÁCH**

Michaela Nesvadbová

Seminář je financován projektem FRVŠ 1305/2009

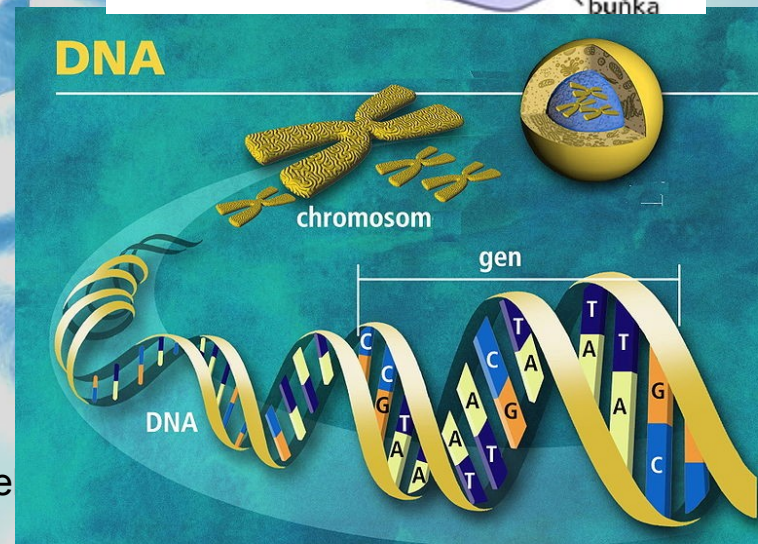
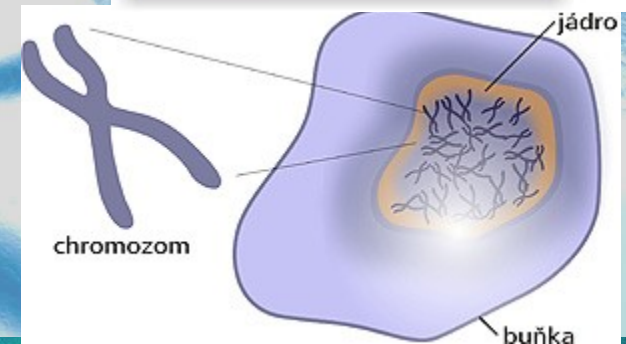
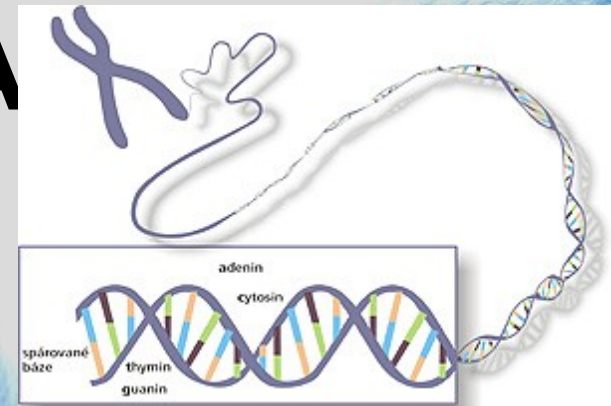
# Význam identifikace živočišných druhů v krmivu a potravinách

- povinností každého výrobce je řádně a pravdivě označit výrobek tak, aby měl spotřebitel možnost ujistit se o jeho skutečném složení
  - obava spotřebitelů z šíření onemocnění (např. ptačí chřipka, BSE, kulhavka a slintavka)
  - konzumaci některých druhů mas zakazuje náboženství
  - alergie
  - „vlastní odpor“ ke konzumaci některého druhu masa
  - zákaz zkrmování proteinu ze savčích tkání přežvýkavcům – zamezení šíření BSE
  - klamání spotřebitelů (např. záměna masa za maso méně jakostní)



# Buňka a DNA

- základní stavební a funkční jednotka těl (buněčných) organismů je **buňka**
- velkou část hmoty **jádra** tvoří **chromozomy**
- **DNA** – makromolekula uložené v chromozómech v jádře většiny buněk
- buňka – jádro – chromozomy – chromatin - DNA a histony
- DNA je tvořena **nukleotidy**:
  1. cukr typu pentózy
  2. fosfát
  3. dusíkaté baze:
    - A. puriny: adenin (A), guanin (G)
    - B. pyrimidiny: thymin (T), cytosin (C), (uracil (U))
- důležité vlastnosti DNA:
  - ✓ dusíkaté baze (vlákna DNA) jsou komplementární
  - ✓ denaturace, reasociace DNA
  - ✓ replikace DNA (dělení DNA)
- genetický materiál buňky uložen:
  - nukleární genom
  - mitochondriální genom





# Metody identifikace živočišných druhů v krmivu a potravinách

- různé technologické zpracování výrobků (tepelné úpravy – např. extruze, sterilizace)
- „druhovité složení výrobku“ často nelze určit klasickými metodami (např. mikroskopie)
- v současnosti existuje velké množství analytických metod
- metody molekulární genetiky:
  - založeny na analýze nukleových kyselin
  - molekula DNA je relativně stabilní a odolná vlivům tepelného zpracování
  - DNA je „všudypřítomná“ – lze analyzovat všechny druhy tkání
- nejčastěji využívané metody druhové identifikace:
  - PCR
  - multiplex PCR
  - PCR-RFLP
  - real-time PCR
  - sekvenování
- hlavní výhody metod molekulární genetiky:
  - nejvíce specifické metody
  - schopnost rozlišit různé druhy masa
  - schopnost detekovat i nízké procento přídavku určitého masa



# Polymerázová řetězová reakce (PCR)

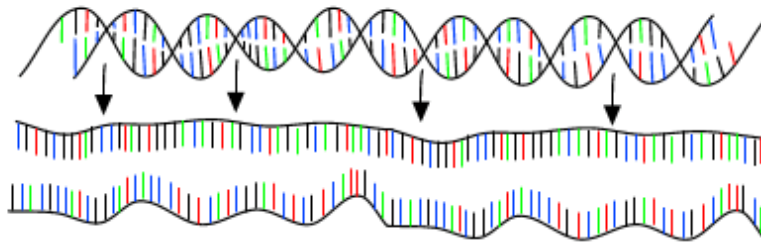
- založena na principu *replikace nukleových kyselin*
- **složení reakční směsi:**
  - destilovaná voda
  - pufr
  - nukleotidtrifosfáty (ATP, GTP, CTP, TTP)
  - primery (přímý, zpětný)
  - Taq polymeráza
  - (Mg<sup>2+</sup>)
- podstatou je **cyklicky se opakující syntéza** nových řetězců vybraných úseků DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA polymerázy
- slouží k vytvoření mnoha milionů identických kopií vzorového fragmentu DNA pro další analýzy



- 
- **Princip (jednotlivé kroky) PCR:**
    1. **Denaturace**
      - 95°C
      - dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a **vzniká jednovláknová DNA**
    1. **Annealing – nasedání, připojení primerů**
      - 50-65 °C
      - **nasednutí primerů** na specifická místa DNA
      - na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza
    1. **Elongace, extenze – syntéza DNA**
      - teplota závisí na použité DNA polymeráze
      - dochází k **syntéze DNA**
      - od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA
  - tyto kroky se cyklicky opakují a počet kopií **vlákna DNA exponenciálně vzrůstá** (v případě, že na začátku byla ve vzorku pouze jediná molekula DNA, po 32 cyklech teoreticky dostaneme až 1 miliardu nesyntetizovaných vláken DNA)

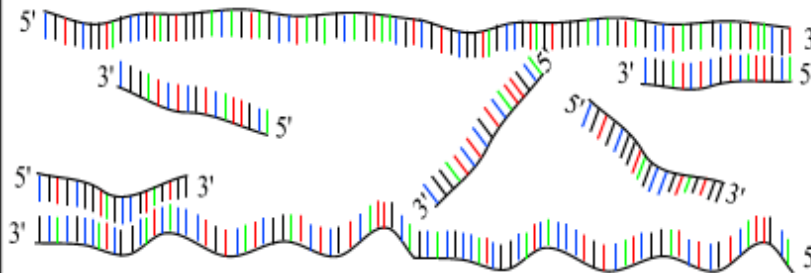
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



**Step 1 : denaturation**

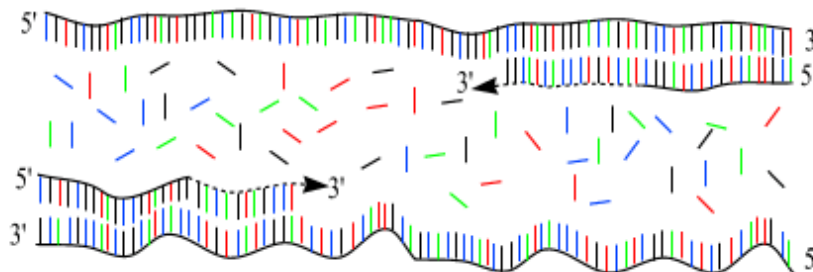
1 minut 94 °C



**Step 2 : annealing**

45 seconds 54 °C

**forward and reverse  
primers !!!**



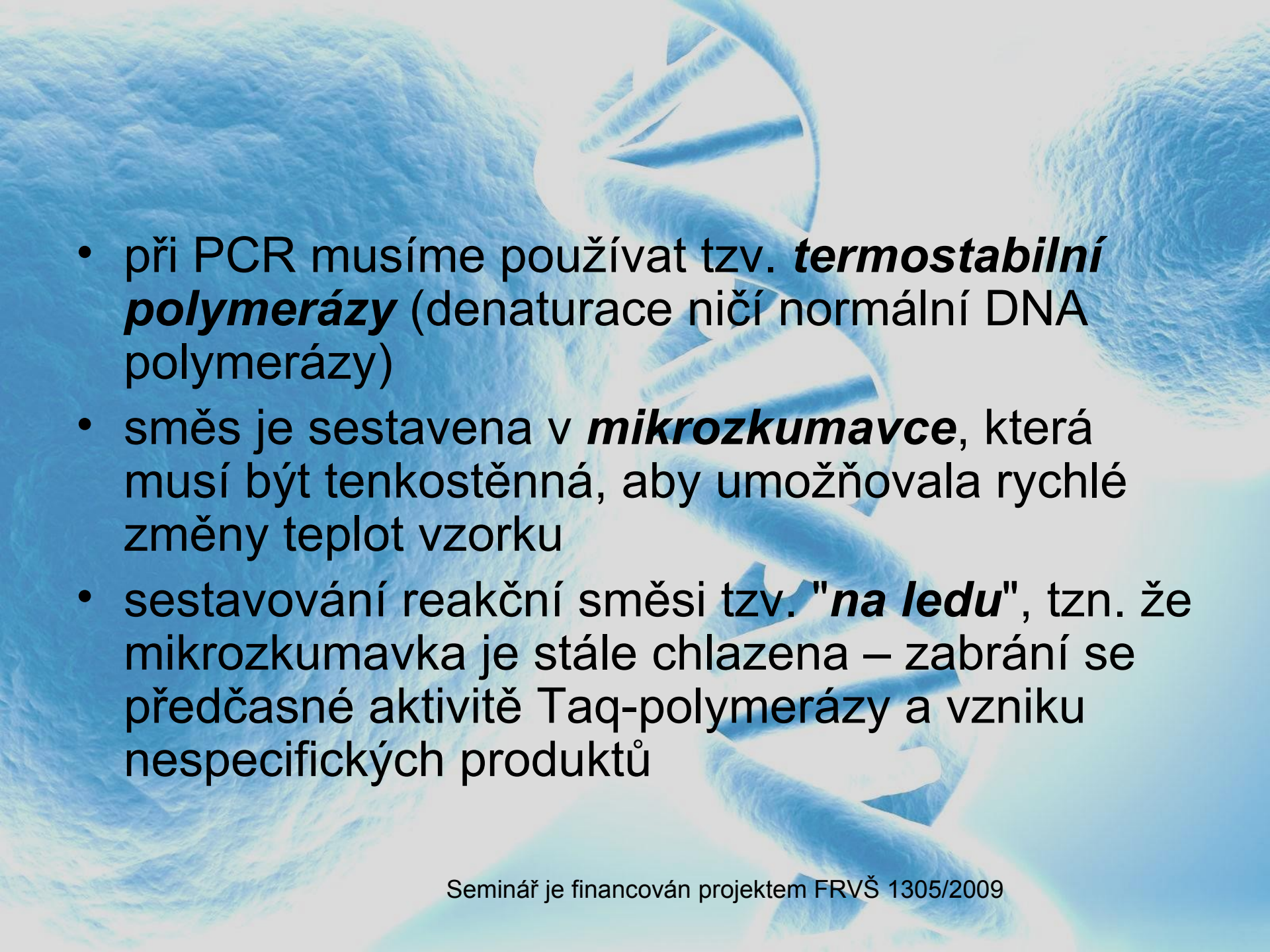
**Step 3 : extension**

2 minutes 72 °C

**only dNTP's**

(Andy Vierstraete 1999)



- 
- při PCR musíme používat tzv. **termostabilní polymerázy** (denaturace ničí normální DNA polymerázy)
  - směs je sestavena v **mikrozkumavce**, která musí být tenkostěnná, aby umožňovala rychlé změny teplot vzorku
  - sestavování reakční směsi tzv. "**na ledu**", tzn. že mikrozkumavka je stále chlazená – zabrání se předčasné aktivitě Taq-polymerázy a vzniku nespecifických produktů



# Molekulární podstata identifikace druhů

- detekce mitochondriální DNA
- výhody (ve srovnání s nukleární DNA):
  - vyšší obsah v tkáních
  - vyšší počet bodových mutací – snazší definování druhů (i příbuzných)
- sekvence jsou dostupné v databázích

# CLUSTAL 2.0.11 multiple sequence alignment

```

gallus_gallus      -AAAAGACTTAGTCCTAACCTTTCTATTGGTTTTTGCTAGACATATACATGCAAGTATCC 59
meleagris_gallopavo -AAAAGACTTAGTCCTAACCTTACTATTGATTTTTGCTAAACATATACATGCAAGTATCC 59
anser_anser        --AAAGACTTAGTCCTAACCTTACGGTTGGTTTTTGCTAAATATATACATGCAAGTATCC 58
sus_scrofa          ACACAGGTTTGGTCCTGGCCTTTCTATTAAATTCTTAATAAAATTACACATGCAAGTATCC 60
                    * **  ** *****  **** *  **  **  **  *  ** *****

gallus_gallus      GCATCCCAGTGAAAAATGCCCCCAACCTTTCTTCCCAAGCAAA-----AGGAGCAGGTAT 114
meleagris_gallopavo GCATGCCAGTGAAAAATGCCCT-AACCCCTTAAGAAAAGAATAA-----AGGAGCAGGTAT 113
anser_anser        GCGCCCCAGTGTAAACGCCCTCGACCACCTACCCCCATACAGGCCTTGAGGAGCGGGTAT 118
sus_scrofa          GCGCCCCGGTGAGAATGCCCTCCAGATCTTA---AAGATCAAA-----AGGAGCAGGTAT 112
                    **  **  ***  ** *****  *      *      *****  *****

gallus_gallus      CAGGCACACTCA--GCAGTAGCCCAAGACGCCTTGCTTAAGCCACACCCCCACGGGTACT 172
meleagris_gallopavo CAGGCACACTCT--AATGTAGCCCAAGACGCCTTGCTTGAGCCACACCCCCACGGGTATT 171
anser_anser        CAGGCACACCCAA-GTAGTAGCCCAAGACGCCTCGCT-AAGCCACGCCCCACGGGTATT 176
sus_scrofa          CAAGCACACCTATAACGGTAGCTCATAACGCCTTGCTCAA-CCACACCCCCACGGGAAA- 170
                    **  *****          ***** **  ***** ***  *  ****  *****

gallus_gallus      CAGCAGTAATTAACCTTAAGCAATAAGTGTAAACTTGACTTAGCCATAGCAAC----- 225]
meleagris_gallopavo CAGCAGTAATTAACCTTAAGCAATAAGTGTAAACTTGACTTAGCCATAGCAAC----- 224
anser_anser        CAGCAGTAATTAACATTAAGCAATGAGTGCAAACCTTGACTTAGTTATAGCAACAGCCTAA 236
sus_scrofa          CAGCAGTGATAAAAATTAAGCCATGAACGAAAGTTTGACTAAGTTATATTAAT----- 223
                    ***** **  **  ***** **  *  *  **  ***** **  ***  **

gallus_gallus      --CC-AGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGCCACCGCGGTATACAAGAAACCCAAATCAAT 282
meleagris_gallopavo --TTTAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGCCACCGCGGTATACAAGAAACCCAAATCAAT 282
anser_anser        CTTCAAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGCCACCGCGGTATACAAGAAACCCAAATCAAC 296
sus_scrofa          ----TAGAGTTGGTAAATCTCGTGCCAGCCACCGCGGTATACGATTAAACCCAAATTAAT 279
                    **  *****  *****  *****  *  *****  **

gallus_gallus      AGCT-----ACCCGGCGTAAAGAGTGGCCACATGT-TATCTGCACCAGCTAAGATTAAA 335
meleagris_gallopavo AGCC-----ATCCGGCGTAAAGAGTGGTCACATGC-TATCTATACCAATTAAGATCAAA 335
anser_anser        CGTCCTATTGACACGGCGTAAAGAGTGGTAAAATGCCTATCCTAGCTAACTAAGATCAAA 356
sus_scrofa          AGAT-----CCACGGCGTAAAGAGTGTTTAAGAA---AAAAAATCACAAATAGAGTTAAA 330
                    *      *****  *      *      *      **  *  ***

gallus_gallus      ATGCAACCAAGCTGT CATAAGCCTAAGATCCACCTAAACCCAACCCAAAT--CCATCTTA 393
meleagris_gallopavo GTGTAACCTAAGCTGT CATAAGCCCAAGATTACCTAAGCCAGCCTAAAAAATGATCTTA 395
anser_anser        ATGCAACTGAGCTGT CATAAGCCCAAGATGCACCTAAACACACCATTAGA-TGATCTTA 415
sus_scrofa          TTATAACTAAGCTGTAAAAAGCCCTAGTTAAAATAAAATAACCCACGAAAG-TGACTCTA 389
                    *  ***  ***** *  ***** **  *  *  **      *  **      *  **

gallus_gallus      GCC-TCAACGATTAATTTTAACCCACGAAAGCTAGGACCCAAACTGGGATTAGATACCCC 452

```



- jeden z primerů navržen na „uchovalou“ sekvenci genu
- druhý primer navržen tak, aby nasedal na druhově specifickou sekvenci daného druhu
- amplikony různé délky

12SrRNA

```

gallus_gallus      GAGCACAAACGCTTAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAACCCACCTAGAGGAGCC 572
meleagris_gallopavo GAGCACAAACGCTTAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCTAAACCCACCTAGAGGAGCC 571
anser_anser        GAGCACAAACGCTTAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAACCCACCTAGAGGAGCC 594
sus_scrofa          --TCGCAACTGCCTAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTACATCCACCTAGAGGAGCC 555
                    *  ***  **  *****  *****  *  *  *****

gallus_gallus      TGTTCCTAATCGATAATCCACGATTACCCCAACCCCTTGCCAGCACAGCCTACATA 632
meleagris_gallopavo TGTTCCTAATCGATAATCCACGATTACCCCAACCCCTTGCCAGCACAGCCTACATA 631
anser_anser        TGTTCCTAATCGATAATCCCGATTACCCCAACCCCTTGCCAGCACAGCCTACATA 654
sus_scrofa          TGTTCCTAATCGATAAACCCCGATAGACCTTACCAACCTTGCCAATTGAGCCTATATA 615
                    *****  *****  **  *****  ***  *****  *****

gallus_gallus      ----CATAGAACAAACGAAAAAGGATGTGAAACCCGCCCTTAGAAGGAGGATTTAGCAGT 804
meleagris_gallopavo ----CATAGAACAGACGAAAAAGGGCGTGAAACTCGCCCTTGGAAGGAGGATTTAGCAGT 802
anser_anser        ----CATAGGGCACACGAAAGAAGCGTGAAAC-CACTTCTGGAAGGCGGATTTAGCAGT 826
sus_scrofa          AGAATATCCACCACACGAAAGTTTTTATGAACTAAAAACCA-AAGGAGGATTTAGCAGT 792
                    **      **  ***  **      *****      ****  *****

gallus_gallus      AAAGTGAGATCATACT--CGCTAAGCTCACTTTAAGACGGCTCTGAGGCACGTACATACC 862
meleagris_gallopavo AAAGTAAGACCATACTTCTCTTAAGCCTACTTTAAGACGGCCCTGGGGCAGGTACATACC 862
anser_anser        AAAGTGGGACAATA-----GAGCCTACTTTAAGCCGGCCCTGGGGCAGGTACATACC 878
sus_scrofa          AATCAAGAATAGA-----GTGCTTGATTGAATAAGGCCATGAAGCAGCACACACC 844
                    ***      **  *  *      **  ***  ***  **  *****  ***

gallus_gallus      GCCCGTCACCCTCTTCACAAGC-CATCAACATCAATAAA-TATATACTT-CCCCTCCCGG 919
meleagris_gallopavo GCCCGTCACCCTCTTCACAAGC-TATCAATTTCAATAAA-TA-ATAC---CCAACCCCTAG 916
anser_anser        GCCCGTCACCCTCTTCACAAGC-CA-CATCCACATAAC-TA-ATACCA-TAAATAC--G 931
sus_scrofa          GCCCGTCACCCTCTTCAGCATGTAGTAATAAAAAATAACCTATATTCAATTACACAACCA 904
                    *****  *****  *  *      *****  **  ***

gallus_gallus      CTAAGACGAGGCAAGTCG----- 938
meleagris_gallopavo CTAAGATGAGGTAAGTCGTAAACAGGTAAGCGTACCGGAAGGTGCGCTTAGACTAC- 973
anser_anser        CTGAAGATGAGGTAAGTCGTAAACAGGTAAGTCGTACCGGAAGGTGACTTAGAATAT- 988
sus_scrofa          TGCAGGAAGAGACAAGTCGTAACCAAGGTAAGCATACTGGAAGTGTGCTTGGATTACC 962
                    ****  ***  *****

```

12SF –  
forward primer

12SG – reverse  
primer

12SC – reverse  
primer

12SREV –  
reverse primer

12SS – reverse  
primer

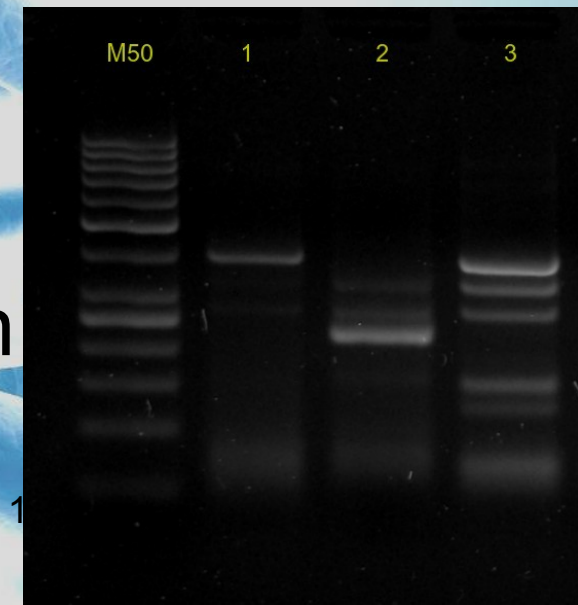
- 
- Výhody:
    - nízké náklady
    - rychlost
    - citlivost (limit detekce DNA okolo 1%)

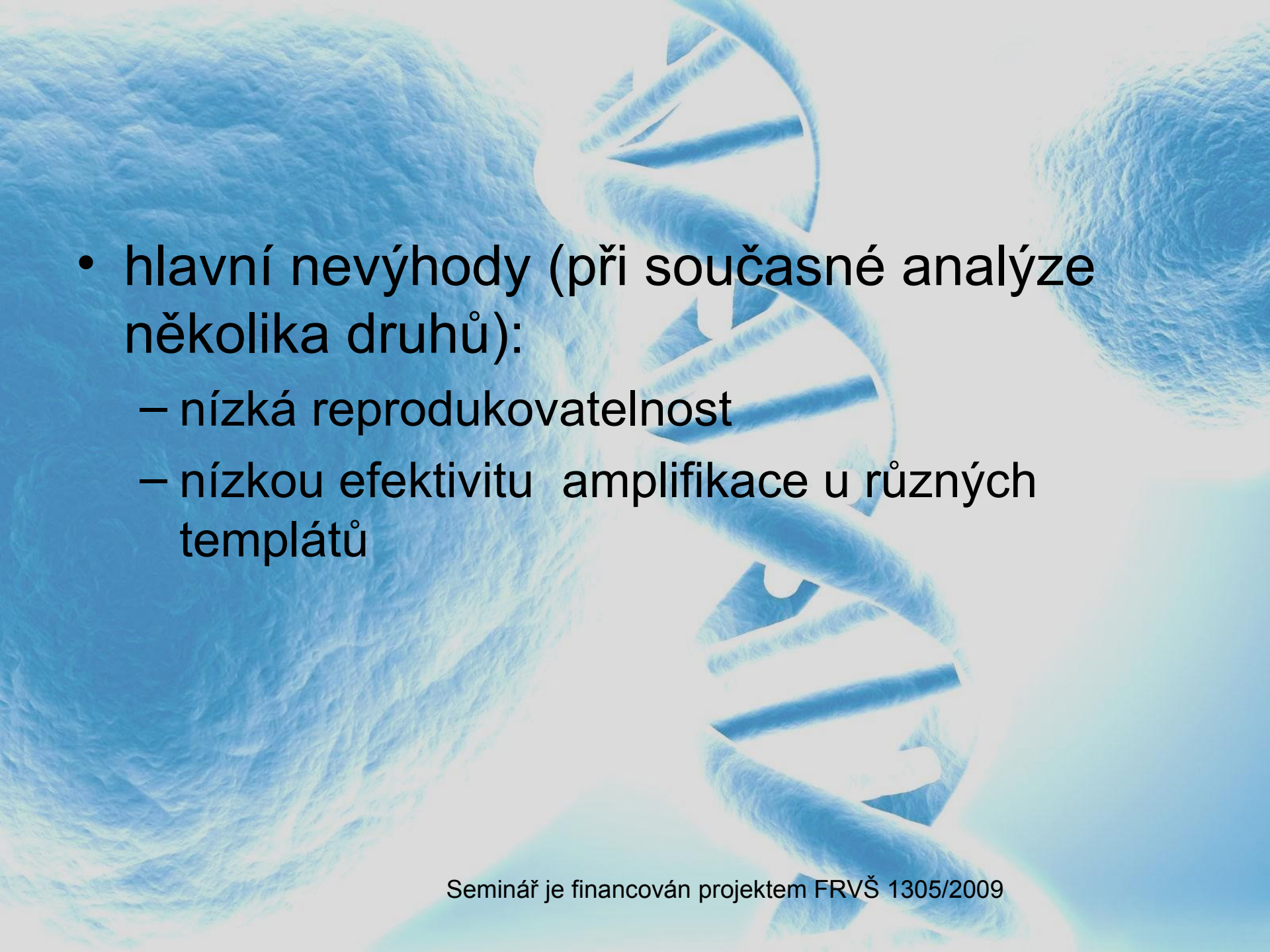
pozn: metoda nedovoluje rozlišit, jakého  
původu je DNA (sval, játra, kůže)



# Multiplex (mnohonásobná) PCR

- varianta PCR reakce
- v reakční směsi několik párů primerů - umožňuje **detekci několika sekvencí současně v jedné reakční směsi**
- hlavní výhodou této varianty jsou nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích

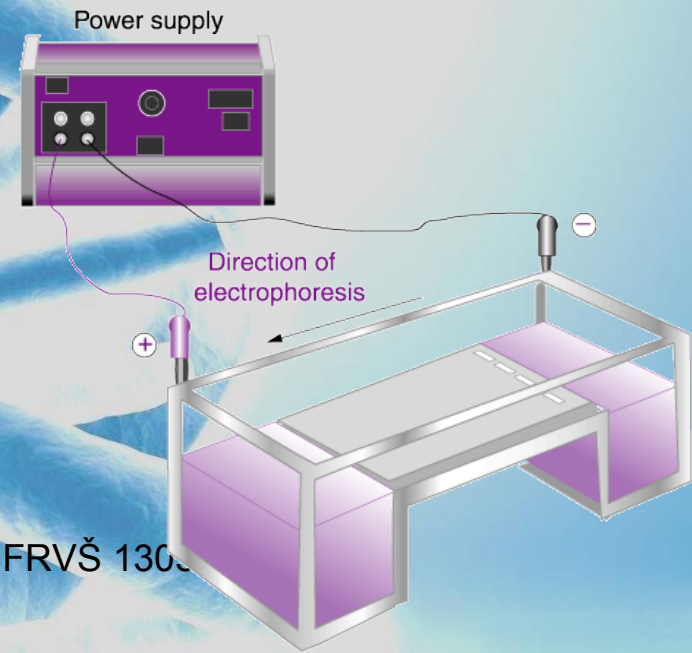


- 
- hlavní nevýhody (při současné analýze několika druhů):
    - nízká reprodukovatelnost
    - nízkou efektivitu amplifikace u různých templátů

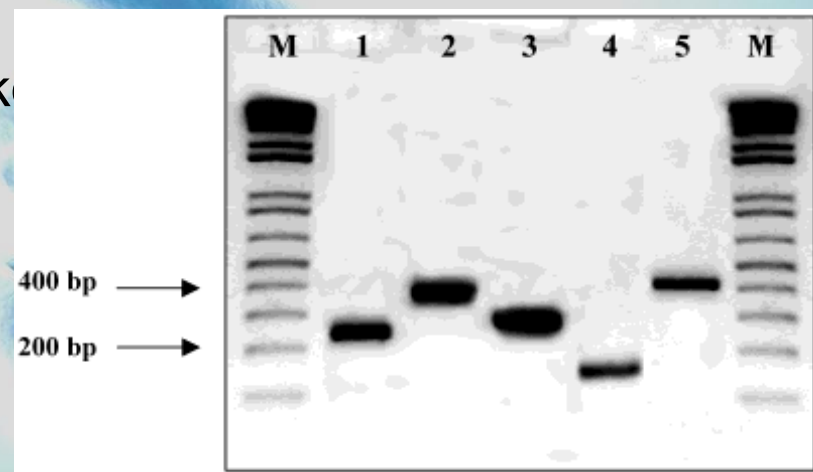


# Gelová elektroforéza (ELFO)

- principem je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli
- nukleové kyseliny mají *záporný náboj* - pohybují k opačně nabité elektrodě - anodě
- elektroforéza se provádí na vhodném nosiči – *gelu* (nejčastěji polyakrylamid nebo agarózou)
- rychlost pohybu molekul DNA v gelu označovaná jako **elektroforetická pohyblivost** je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti
- elektroforéza musí probíhat ve vodném roztoku o stálém pH – pufr



- velikost DNA nebo jejího fragmentu o neznámé velikosti lze stanovit srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul nebo fragmentů o známé velikosti, které se označují jako **hmotnostní markery**
- **sledovací barvivo**
- **zviditelnění molekul - etidiumbromid (EtBr)** - po osvětlení ultrafialovým světlem fluoreskuje
- Molekuly DNA jsou na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA





# Určení přítomnosti DNA živočišných druhů v krmivu

- bylo hodnoceno:
  - 8 granulovaných krmiv
  - 6 konzervovaných krmiv





# Krok za krokem

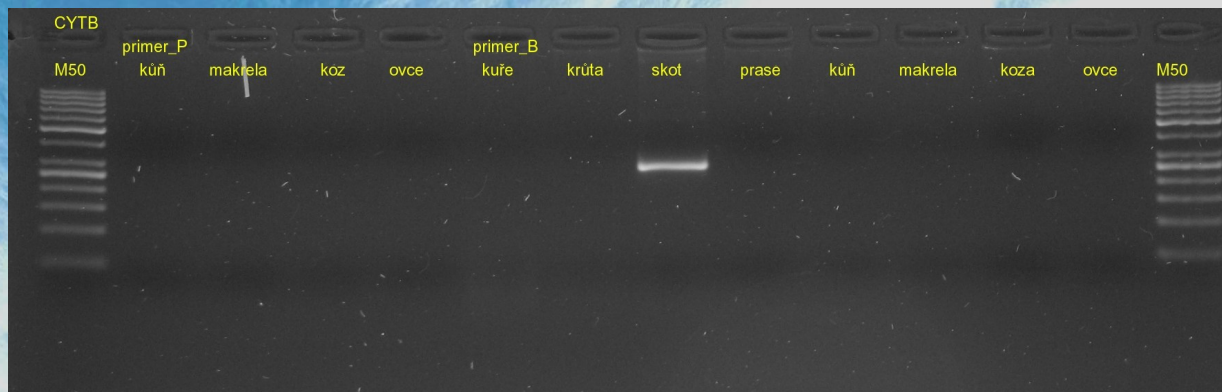
## 1. z původních publikací


- Matsunaga et al. (1999)
- Dalmaso et al. (2003)
- Rodruguez et al. (2003)
  - převzaty primery a podmínky reakce PCR

## 1. testování specifiky a vhodnosti využití primerů

- Dalmaso et al. (2003) a Rodruguez et al. (2003)
  - nevhodné
- Matsunaga et al. (1999) - vhodné





- 
- pomocí PCR identifikovány DNA živočišných druhů dle svých charakteristických velikostí PCR produktů (amplikonů):
    - koza 157 bp
    - kuře 227 bp
    - skot 274 bp
    - ovce 331 bp
    - prase 398 bp
    - kůň 439 bp
  - amplikony sekvenovány
  - výsledky byly porovnány se složením, které uvádí výrobce krmiva



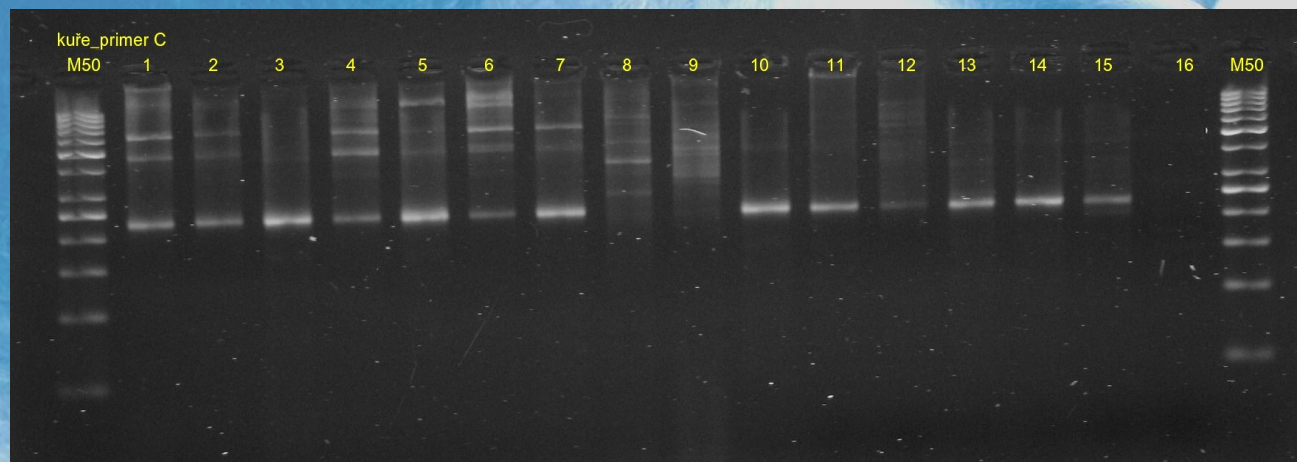
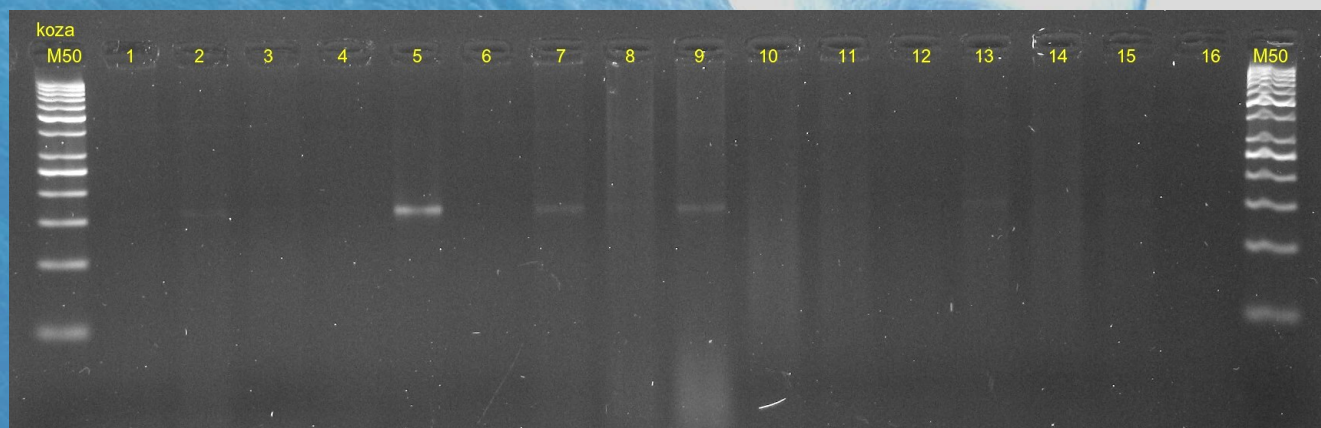
Označení	Složení deklarované výrobcem
vzorek č. 1	drůbeží maso a produkty drůbežího původu, drůbeží tuk, lososový olej
vzorek č. 2	kuře, rybí moučka, živočišný tuk, sušená vejce, kuřecí vnitřnosti
vzorek č. 3	maso a výrobky živočišného původu, oleje a tuky
vzorek č. 4	drůbeží maso a produkty drůbežího původu, sušená vejce, drůbeží tuk, lososový olej
vzorek č. 5	kuřecí a krůtí moučka, vnitřnosti, živočišný a rybí tuk, vaječná hmota
vzorek č. 6	kuřecí maso, živočišný tuk, vedlejší výrobky živočišného původu, rybí tuk a bílkoviny, sušené vejce
vzorek č. 7	maso a výrobky živočišného původu, kuřecí maso, mléko a mléčné deriváty
vzorek č. 8	maso a výrobky živočišného původu, drůbeží moučka, oleje a tuky, ryby a vedlejší výrobky z ryb

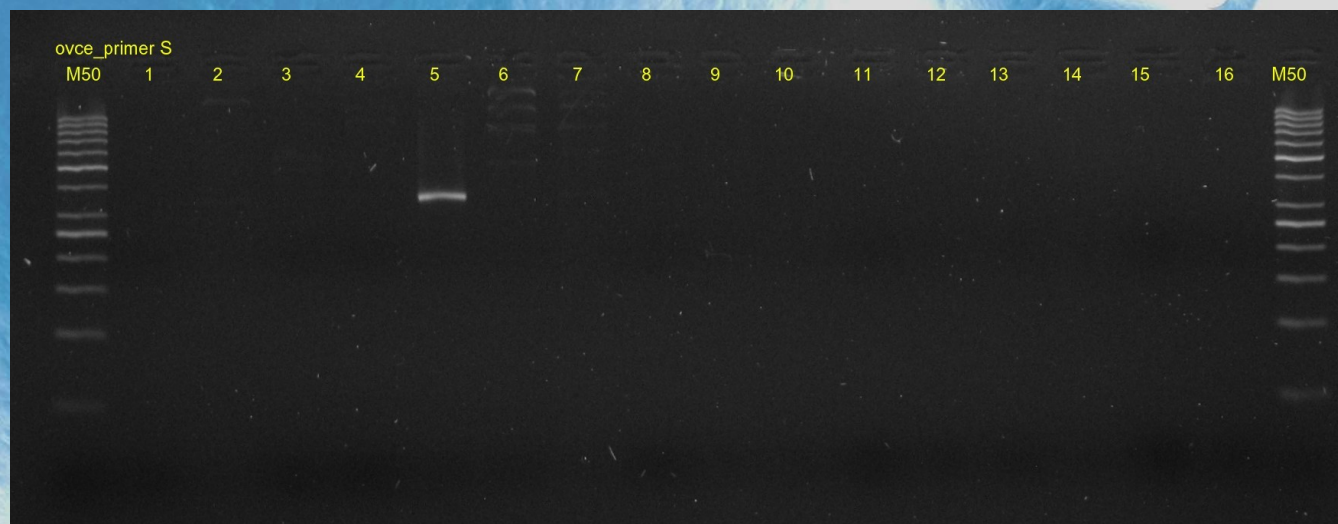
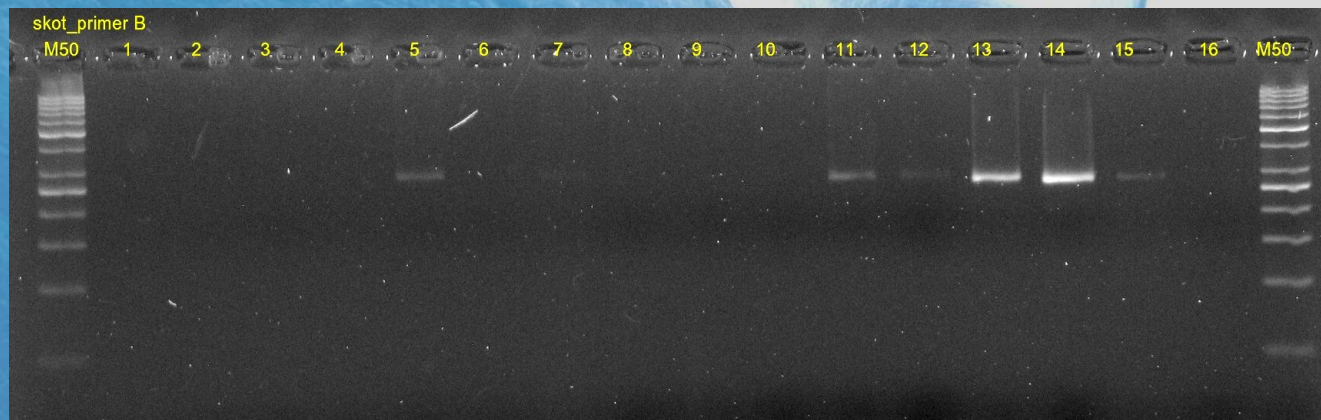
Označení	Identifikace DNA živočišného druhu					
	koza	kuře	skot	ovce	prase	kůň
vzorek č. 1	-	+	-	-	+	-
vzorek č. 2	+	+	-	-	+	-
vzorek č. 3	+	+	-	-	+	-
vzorek č. 4	-	+	-	-	+	-
vzorek č. 5	-	+	-	-	+	-
vzorek č. 6	+	+	+	+	+	-
vzorek č. 7	-	+	-	-	+	-
vzorek č. 8	-	+	+	-	+	-

Označení	Složení deklarované výrobcem
vzorek č. 1	maso a výrobky živočišného původu, hovězí, kuřecí a králičí maso
vzorek č. 2	vepřové maso
vzorek č. 3	maso a výrobky živočišného původu, zvěřina
vzorek č. 4	hovězí maso, drůbeží játra, vedlejší živočišného produkty
vzorek č. 5	maso a výrobky živočišného původu, kuřecí a krůtí maso
vzorek č.6	maso a výrobky živočišného původu, jehněčí maso

Označení	Identifikace DNA živočišného druhu					
	koza	kuře	skot	ovce	prase	kůň
vzorek č. 1	-	+	+	-	+	-
vzorek č. 2	-	+	+	-	-	-
vzorek č. 3	-	+	+	-	+	-
vzorek č. 4	-	+	+	-	+	-
vzorek č. 5	-	+	+	-	-	-
vzorek č.6	-	+	+	-	+	-







Seminář je financován projektem FRVŠ 1305/2009



# PCR - RFLP

- ***modifikace standardní PCR***
- výsledkem PCR reakce jsou produkty o stejné délce
- tyto produkty jsou štěpeny ***restrikčními endonukleázou*** a poté analyzovány elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu
- ***Restrikční endonukleázy (restriktázy):***
  - bakteriální enzymy
  - rozpoznávají v molekule DNA krátké specifické sekvence (dlouhé zpravidla 4-6bp)
  - v místě výskytu této specifické sekvence molekulu štěpí (***restrikční místo***)
  - počet restrikčních míst je závislý na velikosti zkoumané sekvence

gacctcccagccccctcaaacatctcatcatgatgaaacttcggttccctcttaggcattctgctaattcttgcaa base pairs  
ctggaggggtcgggggagtttgttagagtagtactactttgaagccaaggggagaatccgtagacggattagaacgtt 1 to 75

atcctaacaggcctgttcttagcaatacattacacatcagacacaacaacagctttctcatcagttacacacatt base pairs  
taggattgtccggacaagaatcgttatgtaatgtgtagtcgtgttgtgtcgaaagagtagtcaatgtgtgtaa 76 to 150

tgtcgagacgtaaattacgggatgagttattcgctatctacatgcaaacggagcatccatattctttatttgcta base pairs  
acagctctgcatttaatgcctactcaataagcgatagatgtacgtttgcctcgtagggtataagaaataaacggat 151 to 225

ttcatccacgtaggccgaggtctatactacggatccctatatattcctagaaacatgaaacattggagtagtccta base pairs  
aagtaggtgcacccgggtccagatatgatgcctaggatatataaggatctttgtactttgtaacctcatcaggat 226 to 300

**BseRI (370)**

ctatttacggttatagcaacagccttcattaggctacgtcctgcctgaggacaaatatcattctgaggagctacg base pairs  
gataaatggcaatatcgttgtcggaagtatccgatgcaggacgggactcctgtttatagtaagactcctcgatgc 301 to 375

gtcatcacaaatctactatcagg base pairs  
cagtagtgtttagatgatagtcg 376 to 398

gaccttcagcccccatcaaacatttcattcatcatgatgaaatttcggttccctcctgggaatctgctaattcctacaa base pairs  
ctggaaggtcggggtagtttgtaaagtagtactacttttaaagccaagggaggacccttagacggattaggatgtt 1 to 75

**BseRI (137)**

atcctcacaggcctattcctagcaatacactacacatccgacacaacaacagcattctcctctgttacctatc base pairs  
taggagtgtccggataaggatcgttatgtgatgtgtaggctgtgttgtgtcgtaagaggagacaatgggtatag 76 to 150

tgccgagacgtgaactacggctgaatcatccgatacatacacgcaaacggagcttcaatgttttttatctgctta base pairs  
acggctctgcacttgatgcgacttagtaggctatgtatgtgcgtttgcctcgaagttacaaaaaatagacgaat 151 to 225

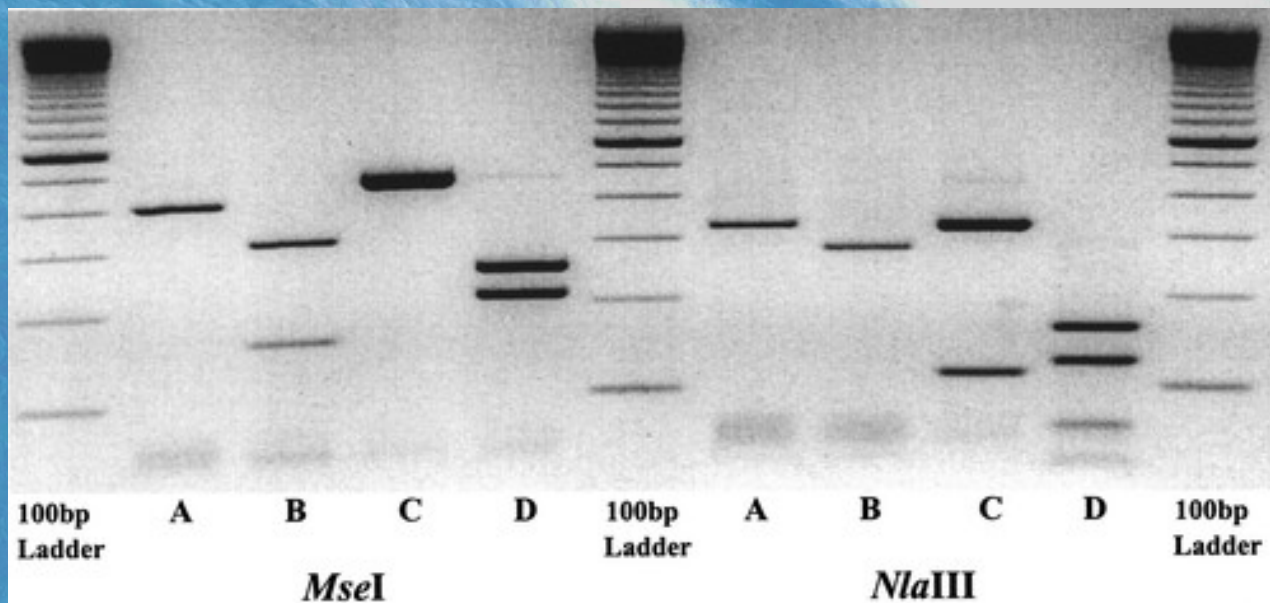
tatatgcacgtaggacgaggttatattacgggtcttacacttttctagaacatgaaatattggagtaatcctt base pairs  
atatacgtgcacctcgtccgaataaatgccagaatgtgaaaagatctttgtactttataacctcattaggaa 226 to 300

**BseRI (370)**

ctgctcacagtaatatagccacagcatttataggatacgtcctaccatgaggacaaatatcattctgaggagcaaca base pairs  
gacgagtgtcattatcgggtgtcgtaaatatcctatgcaggatggtactcctgtttatagtaagactcctcgttgt 301 to 375

gtcatcacaaacctcttatcagg base pairs  
cagtagtgtttggagaatagtcg 376 to 398





# Real-Time PCR

- metoda založená na polymerázové řetězové reakci
- umožňuje:
  - monitorovat vznik produktu v průběhu PCR reakce
  - přímou kvantifikaci PCR produktu v průběhu reakce (real time)
  - zjistit přítomnost produktu reakce v okamžiku jeho vzniku, nikoliv až po zastavení reakce (a provedení elfo)
- kvantifikace amplikonu se provádí prostřednictvím **detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu ve speciálním cykleru**, který kromě cyklického střídání teplot umožňuje monitorování postupu PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat produkty PCR elektroforeticky (u klasické PCR se detekuje až finální produkt)





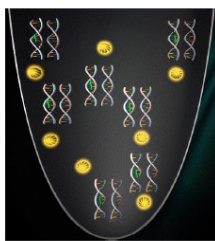
- použití **fluorescenčních látek** (SyberGreen, fluorescenčně značené sondy, fluorescenčně značené primery)
- průběh reakce:
  - templát je nejprve jednořetězcový – přístroj nezaznamenává signál
  - při PCR se vytváří dvouřetězcový produkt a fluorescenční barvivo fluoreskuje po navázání na dvořetězcovou DNA
  - pokud se vytvoří adekvátní množství produktu a hladina fluorescence je dostatečná, přístroj signál zachytí
  - v dalších cyklech se míra emitované fluorescence bude dále zvyšovat

Step 1



The SYBR Green I dye within the Fast SYBR Green Master Mix immediately binds with all double-stranded DNA

Step 2



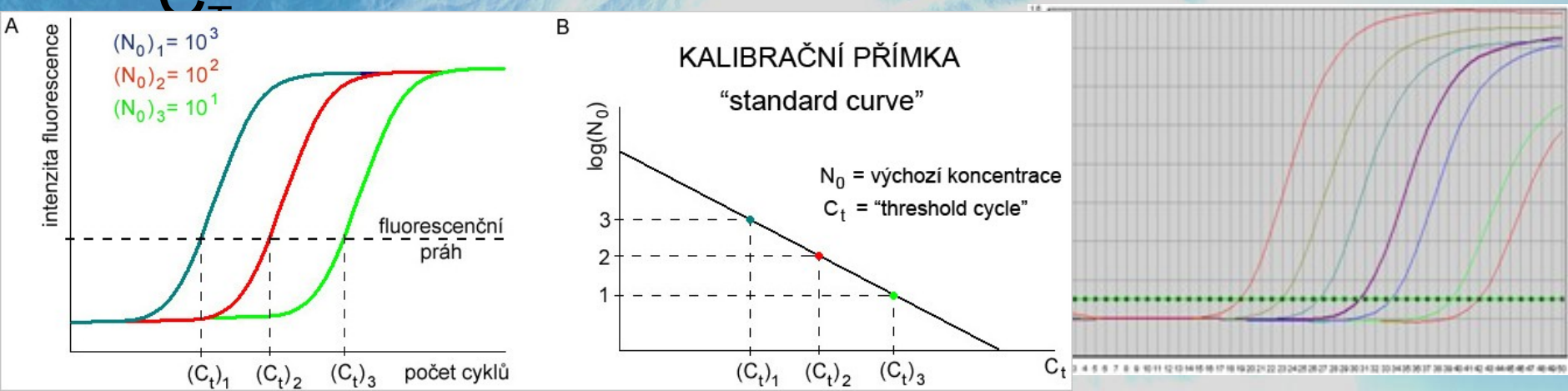
During PCR, AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, UP amplifies each target.

Step 3



The SYBR Green I dye then binds to each new copy of double-stranded DNA.

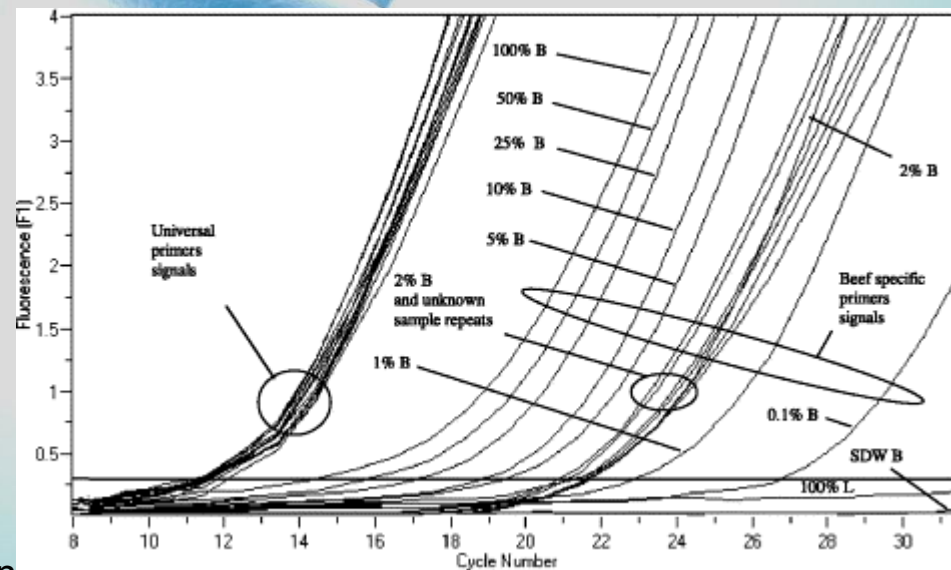
- lze určit počet cyklů nutných pro vytvoření detekovatelného množství produktu – hodnota se označuje  $C_T$
- $C_T$  hodnota – čím vyšší je množství prvotního templátu, tím nižší je hodnota  $C_T$





# Příklad využití metody

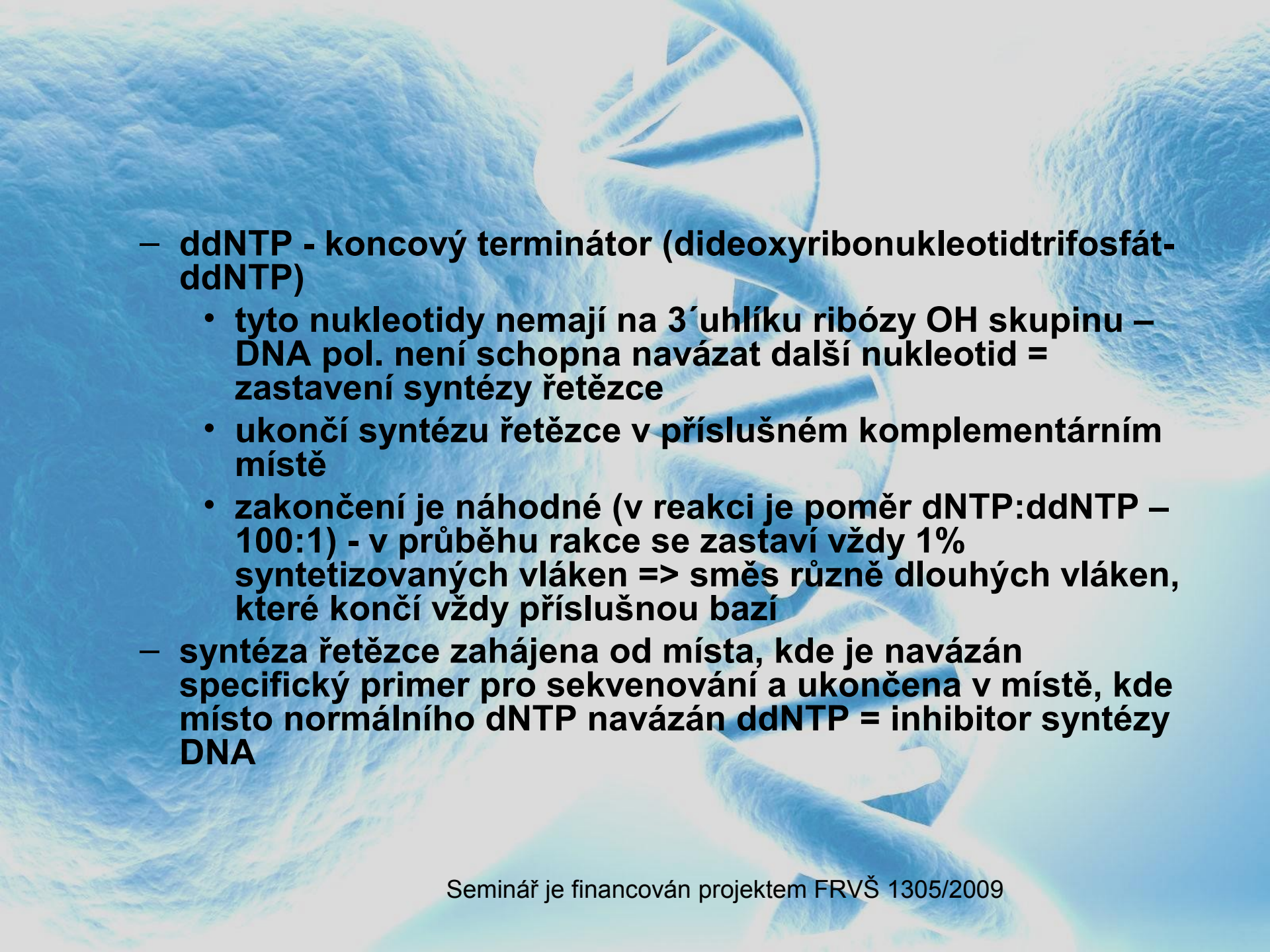
- určení obsahu určitého druhu masa ve vzorku:
  - porovnání  $C_T$  hodnot neznámých vzorků se standardy (vzorky, které obsahují známé množství určitého druhu masa)
  - z kalibrační přímky („standard curve“) lze odečíst výchozí koncentraci neznámého vzorku

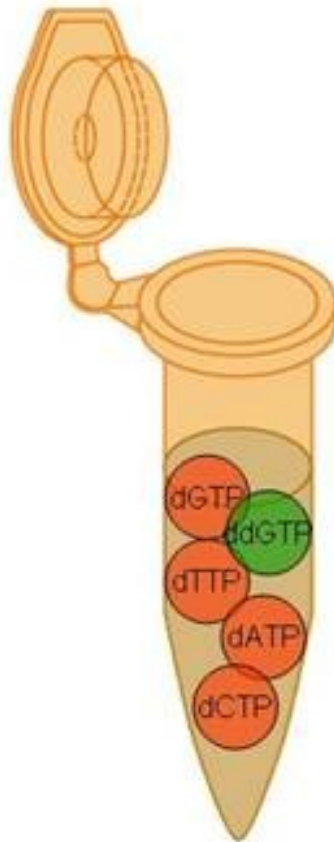


# Sekvenování

- **stanovení primární struktury neboli pořadí nukleoidů v molekulách DNA**
- **dvě metody sekvenování:**
  - chemická
  - enzymatická metoda
- **enzymatická metoda sekvencování DNA:**
  - v současnosti nejběžnější metoda
  - využívá principu PCR (templátová DNA množena pomocí primerů a polymerázy)
  - **primer je pouze jeden - dochází k syntéze jen jednoho řetězce v jednom směru**
  - sekvenační reakce je prováděna ve 4 různých vzorcích, které obsahují:
    - molekulu DNA, jejíž sekvence má být stanovena
    - primer
    - směs obsahující 4 normální nukleotidy a jeden ze čtyř ddNTP
    - DNA polymerázu



- 
- **ddNTP - koncový terminátor (dideoxyribonukleotidtrifosfát-ddNTP)**
    - tyto nukleotidy nemají na 3'uhlíku ribózy OH skupinu – DNA pol. není schopna navázat další nukleotid = zastavení syntézy řetězce
    - ukončí syntézu řetězce v příslušném komplementárním místě
    - zakončení je náhodné (v reakci je poměr dNTP:ddNTP – 100:1) - v průběhu reakce se zastaví vždy 1% syntetizovaných vláken => směs různě dlouhých vláken, které končí vždy příslušnou bází
  - syntéza řetězce zahájena od místa, kde je navázán specifický primer pro sekvenování a ukončena v místě, kde místo normálního dNTP navázán ddNTP = inhibitor syntézy DNA



5' -GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAA**G**  
 3' -GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5' -GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCC**G**  
 3' -GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

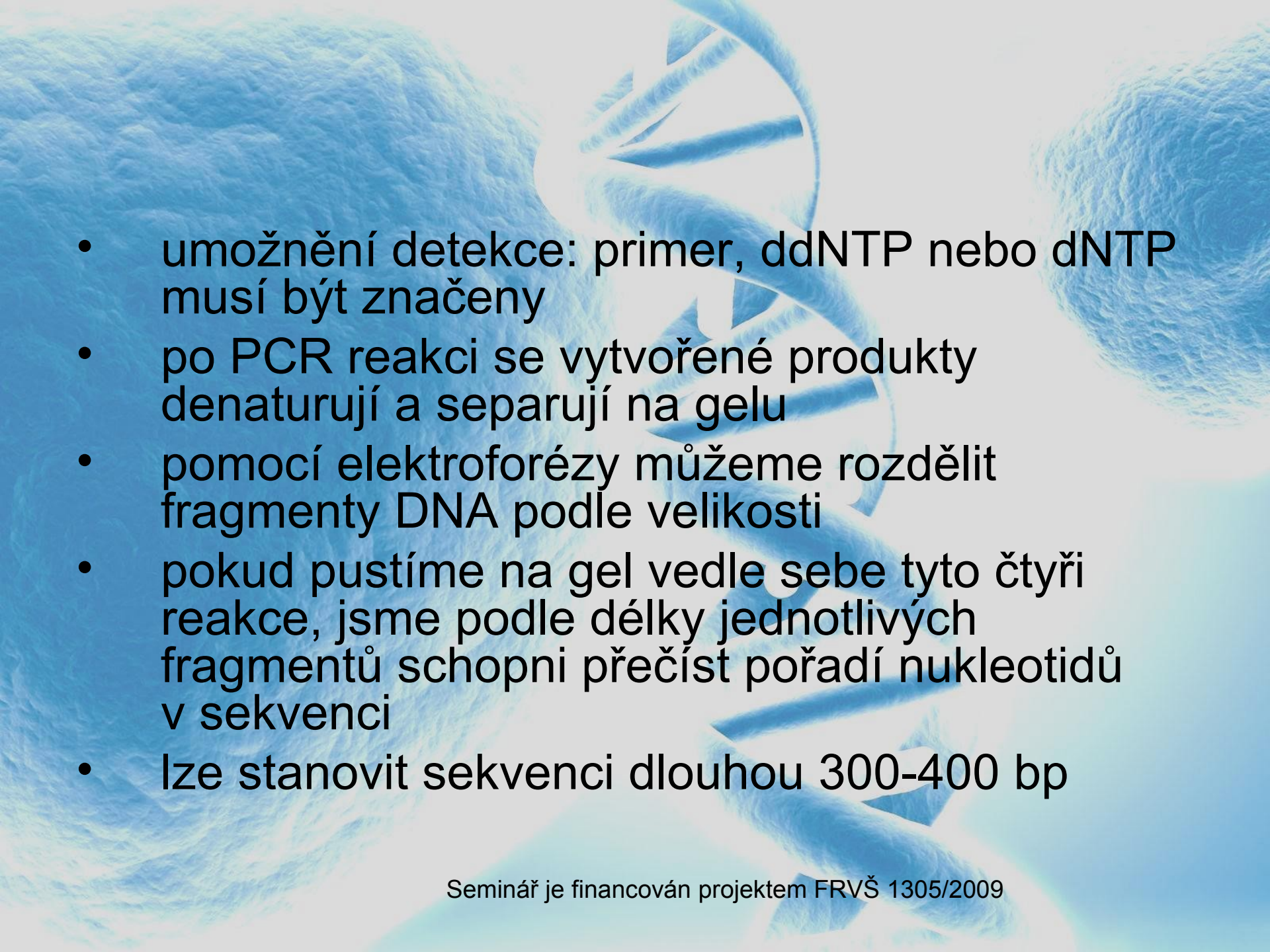
5' -GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCC**G**  
 3' -GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

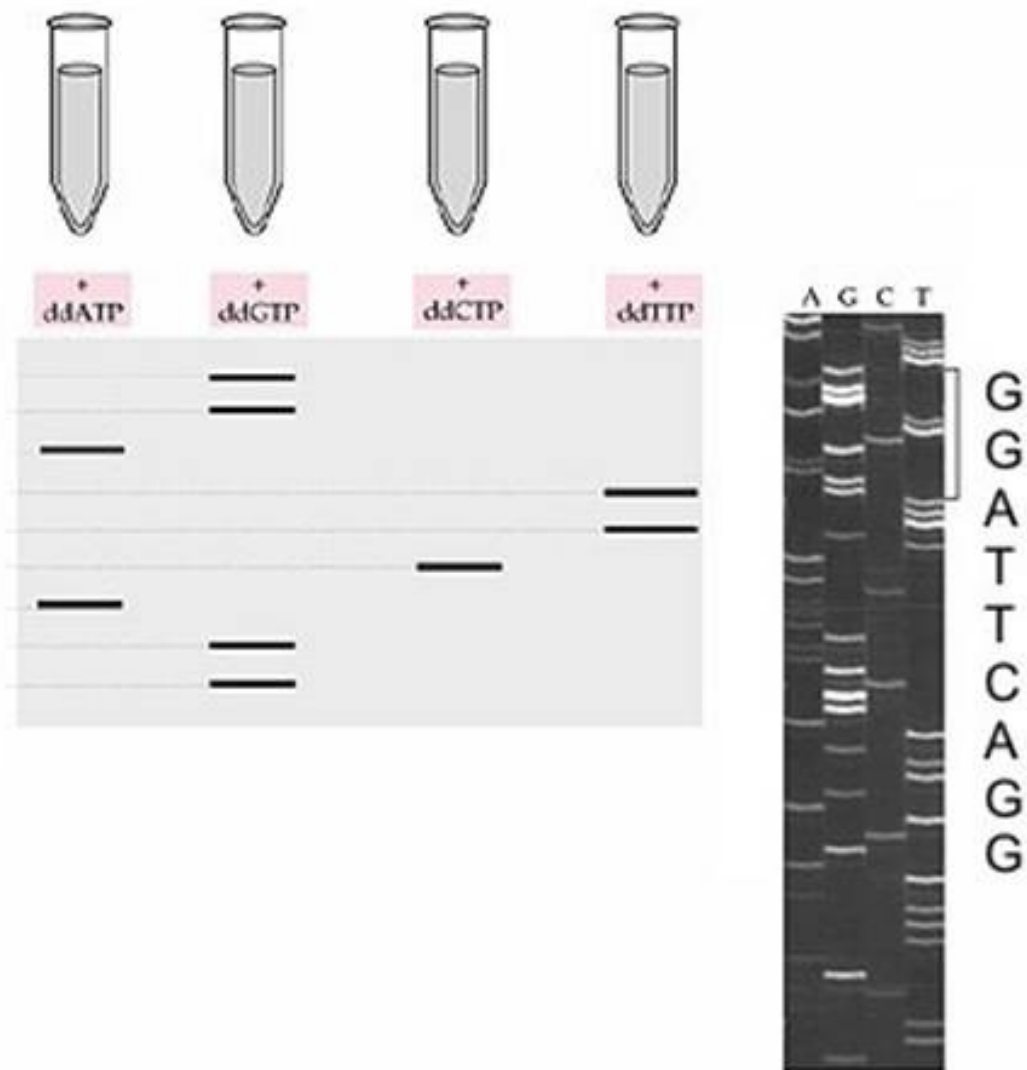
5' -GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCCGGAT**G**  
 3' -GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5' -GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCCGGATG**G**  
 3' -GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5' -GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCCGGATGGTACTTCTA**G**  
 3' -GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'



- 
- umožnění detekce: primer, ddNTP nebo dNTP musí být značeny
  - po PCR reakci se vytvořené produkty denaturují a separují na gelu
  - pomocí elektroforézy můžeme rozdělit fragmenty DNA podle velikosti
  - pokud pustíme na gel vedle sebe tyto čtyři reakce, jsme podle délky jednotlivých fragmentů schopni přečíst pořadí nukleotidů v sekvenci
  - lze stanovit sekvenci dlouhou 300-400 bp





# Automatické sekvenování DNA

- stanovení a zpracování sekvencí podstatně rychlejší
- lze stanovit sekvenci dlouhou 500 - 1000 bp
- jednotlivé dideoxynukleotidy jsou značeny čtyřmi různými fluorescenčními značkami
- proto je možné původně čtyři reakce sloučit do jedné zkumavky
- analýza tzv. kapilární elektroforézou
  - fragmenty se na základě velikosti rozdělí tím, jak putují kapilárou
  - na konci kapiláry je detektor (laser), schopný zaznamenat barvu právě projíždějícího nukleotidu







DĚKUJI ZA POZORNOST

Seminář je financován projektem FRVŠ 1305/2009